



<b>(51) 国際特許分類7</b> <b>G01N 27/327, C12Q 1/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO00/63685</b>  <b>(43) 国際公開日</b> <b>2000年10月26日(26.10.00)</b>
<b>(21) 国際出願番号</b> <b>PCT/JP00/02417</b>  <b>(22) 国際出願日</b> <b>2000年4月13日(13.04.00)</b>  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平11/107691      1999年4月15日(15.04.99)      JP  <b>(71) 出願人 ; および</b> <b>(72) 発明者</b> 六車仁志(MUGURUMA, Hitoshi)[JP/JP] 〒782-0051 高知県香美郡土佐山田町楠目738-5 Kochi, (JP) 平塚淳典(HIRATSUKA, Atsunori)[JP/JP] 〒154-0005 東京都世田谷区三宿2-16-36 三宿アベハイツ302 Tokyo, (JP) 輕部征夫(KARUBE, Isao)[JP/JP] 〒216-0002 神奈川県川崎市宮前区東有馬一丁目3番16号 Kanagawa, (JP) <b>(74) 代理人</b> 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)		<b>(81) 指定国</b> AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  <b>添付公開書類</b> 国際調査報告書
<b>(54)Title:    BIOSENSOR</b>  <b>(54)発明の名称    パイオセンサー</b>  <div style="text-align: center;"> <p style="text-align: center;">CROSS SECTION X-X'</p> <p>5... ENZYME          4... PLASMA-POLYMERIZED FILM          3... PLATINUM ELECTRODE PATTERN          2... PLASMA-POLYMERIZED FILM          1... SUBSTRATE</p> </div>		
<b>(57) Abstract</b> A novel high-performance biosensor including a plasma-polymerized film, produced by a simpler method, and applicable to a wide range of fields.		

(57)要約

プラズマ重合膜を用いることで新規のバイオセンサーを実現した。本発明のバイオセンサーは、より簡便な方法で高性能なセンサーを実現できるとともに、より広範囲に応用できる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ベトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KF	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

- 1 -

## 明細書

## バイオセンサー

技術分野

この発明は、酵素のような触媒活性を持つ成分を固定化したバイオセンサーとその使用に関する。

背景技術

酵素のような触媒活性を持つ物質を利用したバイオセンサーは、グルコースの他にも様々な分析対象成分に応用されている。このようなバイオセンサーは、微量の酵素によって様々な酵素基質を精度良く、しかも簡単に測定することができる。旧来の溶液中における酵素反応に対して、バイオセンサーは経済性や操作性の点でたいへん有利な分析システムとされている。酵素活性を利用したバイオセンサーの中で、現在最も広く普及しているものとしてグルコースセンサーを挙げることができる。

成人病の1つである糖尿病の患者は1日に数回血糖値を測定し、得られた測定値に基づいてインスリン投与と、食事のコントロールをしなければならない。このため糖尿病の患者には、血中のグルコース濃度を簡便に知ることができるグルコースセンサーが不可欠である。また、医療や食品工業の現場においてもグルコースセンサーは有用なツールとなりうる。

現在、市販されているグルコースセンサーは、松下電器産業（株）によって開発された。このグルコースセンサーは、酵素であるグルコースオキシダーゼ（以下GODと省略することもある）を固定した電極からなっている。実際の使用にあたっては、センサーチップの先に採取した血液を一滴浸し、測定機器に挿入するだけで短時間に血糖値が表示される。特開平 1-253648、特公平 5-24453、特開

平 6-213858、特開平 1-156658、特公平 6-58338、および特開昭 63-139243 などには、このようなグルコースセンサーに関する記述がある。

このセンサーチップは、基板上に印刷された銀ペーストまたはカーボンペースト電極パターンにグルコースオキシダーゼ、フェリシアン化カリウムおよびカルボキシメチルセルロースを含む水溶液を塗布し乾燥させることにより製造されている。センサーチップを構成するフェリシアン化カリウムはメディエータと呼ばれ、酵素反応によって生じた電子と電極の仲介をする物質である。このセンサーチップの表面に測定対象物を滴下すると、まず[1]のような反応が起こる。さらに還元型酵素はフェリシアン化カリウムと[2]のような反応を起こす。ここでフェリシアン化カリウムとフェロシアン化カリウムは、相互に酸化型と還元型の分子種である。そして最後に還元型メディエータが電極上で[3]のような酸化反応を起こす。この酸化電流値を測定することでグルコース濃度を検知することができる。

[1] グルコース+酸化型 GOD

→グルコン酸+還元型 GOD

[2] 還元型 GOD+フェリシアン化カリウム

→酸化型 GOD+フェロシアン化カリウム

[3] フェロシアン化カリウム

→フェリシアン化カリウム+電子

上記の反応を支えるメディエータには、主に次の役割がある。すなわち第一に、メディエータは試料中に共存する成分の影響を抑制する。たとえば実際の血中には、アスコルビン酸（ビタミンC）や尿酸のような還元性成分が存在し、酵素反応に基づく酸化電流の検出を妨害する。メディエータを用いることで電流測定時の印加電圧を下げることができ、結果的に還元性妨害物質の影響を受けにくくなる。メディエータの第二の役割は、酵素反応を十分に行わせることにある。糖尿病患者の血中では、特に高レベルのグルコース濃度が見られることがある。限られた溶存酸素では、高レベルのグルコースの酸化が十分に行えない心配がある。

メディエータは、酵素によるグルコースの酸化反応を助け、高レベルのグルコース測定における溶存酸素の影響を小さくする。

このようにGODを利用したグルコースセンサーは、メディエータの働きによって支えられている。しかし、メディエータには以下のような問題点が指摘されている。メディエータ型バイオセンサーに用いられる低分子量のメディエータは、電極上に完全に固定化することが難しい。そのため固定化とはいいながら、長時間使用すれば電極からの離脱が観察される場合がある。したがって、メディエータ型バイオセンサーは、連続使用には適さない。またメディエータにはフェリシアン化合物のように、高い濃度では毒性を示す化合物も用いられる。同じくメディエータとして利用されるフェロセン化合物においても、その離脱によって鉄沈着という弊害を生じる恐れが指摘されている。そのため、体内留置センサーには適さない。体内留置型のバイオセンサーにおける固定化物質の離脱の危険性については、メディエータ以外にも指摘されている。たとえば、離脱した酵素が異種タンパク質として認識されアレルギー反応を引き起こす危険性がある。

次に製造上の問題点として、メディエータの使用に伴って、膜の均質性、再現性、電極との付着性、歩留まりなどの問題が生じている。つまり、電極に酵素とメディエータをカルボキシメチルセルロース膜と共に塗付する方法では、高度な均質性を維持することは困難である。更に、均質性の維持が困難であることから、メディエータ型バイオセンサーは、小型で安価なセンサーには適さないと言える。

バイオセンサーには、酵素のような触媒活性物質を利用したもの以外に、物質間の親和性に基づく反応を応用したものが知られている。前者は触媒性バイオセンサー(catalytic biosensor)、後者は親和性バイオセンサー(affinity biosensor)として区別される。親和性バイオセンサーの代表的なものが、抗原抗体反応を利用した免疫センサー、あるいは相補的な塩基配列からなる核酸どうしの親和性を利用した遺伝子センサーである。さて、親和性バイオセンサーにおいては、抗体や遺伝子の固定にあたり、センサー表面に施したプラズマ重合膜の官能基を利

用する方法が公知である(Trend in Analytical Chemistry Vol.18, pp62-68, 1999)。プラズマ重合膜の表面には官能基が高度に集積されており、そのために高密度のタンパク質を固定化できるとされている。

一方、触媒性バイオセンサーにおいては、半導体表面にプラズマ重合膜を重ねた構造が報告されている(Analytical Letters, 22, 2423-2431, 1989)。この報告ではプラズマ重合膜を利用してはいるものの、半導体のパターンと同じマスクを使ってプラズマ重合膜を形成しているため、半導体の上にはプラズマ重合膜が形成されるが、横断面方向には半導体パターンが露出する構造となってしまう。露出した半導体には試料中の夾雑物質が直接作用し、電気的な測定を妨げることになる。

#### 発明の開示

本発明は、共存妨害物質の影響を受けにくく、しかも優れた応答特性を実現することができるバイオセンサーを、メディエータを利用することなく提供することを課題としている。本発明はまた、反復使用や連続使用においても、バイオセンサーに固定した触媒活性物質の離脱を起こしにくいバイオセンサーの提供を課題とする。更に本発明は、半導体加工技術の特徴である優れた量産性を生かすことができるバイオセンサーを提供することである。

一般的な触媒性バイオセンサーは、酵素と電極の組み合わせから構成されている。いかに効率よく電極の表面に触媒活性物質を固定化するか、にセンサーの特性は支配されると言っても良い。電極表面への酵素の固定は、「酵素固定化技術」あるいは「インターフェース設計」と呼ばれる。本発明者らは前記課題の解決のために新規なインターフェース設計を試みた。そして、インターフェース設計にプラズマ重合膜を用いることにより、触媒活性物質の高度な集積性、あるいは半導体加工技術の応用が可能となることを確認した。更に、プラズマ重合膜が従来の触媒型バイオセンサーでは必須であったメディエータさえも不要とする新規なイ



ンターフェースとして有用であることを見出し本発明を完成した。すなわち本発明は、以下のバイオセンサーに関する。

〔1〕以下の要素で構成されるバイオセンサー。

a) プラズマ重合膜

b) プラズマ重合膜に固定された触媒活性物質、および

c) プラズマ重合膜を介して試料と接触する金属電極パターン

〔2〕金属電極パターンがプラズマ重合膜上に形成され、この金属電極パターンの上に更にプラズマ重合膜を有する〔1〕に記載のバイオセンサー

〔3〕触媒活性物質がプラズマ重合膜上に架橋試薬によって共有結合されている〔1〕に記載のバイオセンサー。

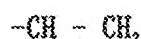
〔4〕触媒活性物質が酵素である〔1〕に記載のバイオセンサー。

〔5〕酵素がオキシダーゼまたはデヒドロゲナーゼである〔4〕に記載のバイオセンサー。

〔6〕オキシダーゼが、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、D-またはL-アミノ酸オキシダーゼ、アミノオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼおよびコリンオキシダーゼからなる群から選択される〔5〕に記載のバイオセンサー。

〔7〕デヒドロゲナーゼが、アルコールデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、フルクトースデヒドロゲナーゼ、ソルビトールデヒドロゲナーゼおよびグリセロールデヒドロゲナーゼからなる群から選択される〔5〕に記載のバイオセンサー。

〔8〕プラズマ重合膜が-COOH基、-CHO基、-SH基、-NH<sub>2</sub>基、-OH基、=NH基、-CONH<sub>2</sub>基、-NCO基、-CH=CH<sub>2</sub>基、=C=O基、および



0

からなる群から選択される官能基の1または2以上を含む、〔1〕に記載のバイオセンサー。

〔9〕プラズマ重合膜が2層以上の多層構造をなすことを特徴とする、〔1〕のバイオセンサー。

〔10〕プラズマ重合膜に、重合性あるいは非重合性モノマーの原料により第2のプラズマ重合膜を積層した、〔1〕に記載のバイオセンサー。

〔11〕前記非重合性モノマー原料が窒素、アンモニア、ヒドラジン、硫化水素、二硫化水素、酸素、水素、水、ハロゲンガス、および希ガスからなる群から選択される〔10〕に記載のバイオセンサー。

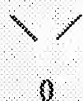
〔12〕次の工程を含む触媒活性物質による基質成分の測定方法において、バイオセンサーがプラズマ重合膜を介して試料と接触する金属電極パターンを備え、かつプラズマ重合膜に触媒活性物質を固定したバイオセンサーである測定方法

- a) 触媒活性物質を固定したバイオセンサーに試料を接触させる工程
- b) 触媒活性物質と基質との反応に伴う電気的な変化を電極によって検知する工程

プラズマ重合は、真空中でモノマーガスをプラズマ励起によって直接基板表面に成膜を行う技術である。図1に典型的なプラズマ重合装置を示す。モノマーガスの成分によって、さまざまな特徴を持つプラズマ重合膜を得ることができる。プラズマ重合では原理的にはどのようなモノマーを用いても、重合が可能である。通常のポリマーを得るためには二重結合の開裂が必要となるのに対して、プラズマ中ではモノマーガスがばらばらになり多くの活性種を介した重合反応が起きるためである。モノマーガスとして利用する化合物には、重合膜としたときに適当な官能基を与えるものを利用すると、官能基を利用して触媒活性物質を化学的に



結合することができるので有利である。官能基としては、 $-COOH$  基、 $-CHO$  基、 $-SH$  基、 $-NH_2$  基、 $-OH$  基、 $=NH$  基、 $-CONH_2$  基、 $-NCO$  基、 $-CH=CH_2$  基、 $=C=O$  基、および



等を示すことができる。これらの官能基をプラズマ重合膜に与えることができるモノマーガス化合物を次に例示する。すなわち、窒素含有化合物、硫黄含有化合物、並びに酸素を含む炭化水素化合物等である。これらの化合物は、一般的な基板素材であるガラスやシリコン等の表面に対する密着性にも優れた本発明に好適な化合物である。

#### 窒素を含む化合物

窒素を含む化合物としては、炭素(C)、水素(H)および窒素(N)からなり2重結合または3重結合を含む以下のような化合物を示すことができる。すなわち、窒素、ピリジン、アリルアミン、アクリルアミド、アニリン、アリロニトリル、1,2,4-トリアゾール、5-アミノ-1H-テトラゾール、あるいはプロバギルアミン等を示すことができる。この他以下に示すような一般式で表される化合物を利用することもできる。各一般式で表される代表的な化合物を()内に記載した。窒素を含む化合物は、触媒活性物質の化学的な結合に利用することができるアミノ基をプラズマ重合膜の表面に与える。またその膜表面や膜の内部は親水性で、血液のような水性試料との親和性が良好でバイオセンサーに好適な表面特性を実現する望ましい素材である。

一般式： $CH_3-(CH_2)_n-NH_2$  (ただし、 $n$  は1～6の整数である) で表される化合物 (エチルアミン等)

一般式： $(CH_3)_3(CH_2)_nN$  ( $n \geq 0$ ) で表される化合物 (トリエチルアミン( $C_6H_{15}N$ )等)

一般式： $(CH_3)_2(CH_2)_nNH$  ( $n \geq 0$ ) で表される化合物 (ジエチルアミン( $C_6H_{15}N$ )等)

一般式： $CH_2=CH(CH_2)_nNH_2$  ( $n \geq 0$ ) で表される化合物 (アリルアミン  $CH_2=CHCH_2NH_2$

等)

一般式： $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CN}$  ( $n \geq 0$ ) で表される化合物 (アセトニトリル  $\text{CH}_3\text{CN}$  等)

一般式： $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$  (ただし、 $n$  は 1 ~ 6 の整数である。) で表される化合物 (エチレンジアミン、ヘキサメチレンジアミン等)

窒素を含むモノマーガス化合物としては、更に以下のような化合物を示すことができる。

$\text{RaNRb}_2$

ここで Ra および Rb は、 $\text{H}$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$  ( $n \geq 0$ )、鎖中に 2 重結合または 3 重結合あるいは両方の結合を持つアルキル鎖、および分岐または環化アルキル鎖からなる群から選択されるアルキル鎖である。

$\text{RaNRc}$

ここで Rc は、 $\text{H}$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}$  ( $n \geq 0$ )、 $\text{CH}_2$ 、鎖中に 2 重結合または 3 重結合あるいは両方の結合を持つアルキル鎖、および分岐または環化したアルキル鎖からなる群から選択されるアルキル鎖である。

$\text{RdN}$

ここで Rd は、 $\text{H}$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{C}$  ( $n \geq 0$ )、 $\text{CH}$ 、鎖中に 2 重結合または 3 重結合あるいは両方の結合を持つアルキル鎖、および分岐または環化したアルキル鎖からなる群から選択されるアルキル鎖である。

$\text{RaNReNRa}_2$

ここで Ra は前記と同じアルキル鎖である。また Re は、 $\text{H}$ 、 $(\text{CH}_2)_n$  ( $n \geq 0$ )、鎖中に 2 重結合または 3 重結合あるいは両方の結合を持つアルキル鎖、および分岐または環化アルキル鎖からなる群から選択されるアルキル鎖である。

$\text{RfNRgNRh}$

ここで Rf と Rg は、 $\text{H}$  または  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$  ( $n \geq 0$ )、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}$  ( $n \geq 0$ )、 $\text{CH}_2$ 、鎖中に 2 重結合または 3 重結合あるいは両方の結合を持つアルキル鎖、および分岐または環化アルキル鎖からなる群から選択されるアルキル鎖である。

また  $R_h$  は、 $H$ 、 $CH_3(CH_2)_n$  ( $n \geq 0$ )、 $CH_3(CH_2)_nCH$  ( $n \geq 0$ )、 $CH_3(CH_2)_nC$  ( $n \geq 0$ )、 $CH$ 、鎖中に 2 重結合または 3 重結合あるいは両方の結合を持つアルキル鎖、および分岐または環化アルキル鎖からなる群から選択されるアルキル鎖である。

$NR_iN$

ここで  $R_i$  は、 $CH_3(CH_2)_nC$  ( $n \geq 0$ )、鎖中に 2 重結合または 3 重結合あるいは両方の結合を持つアルキル鎖、および分岐または環化アルキル鎖からなる群から選択されるアルキル鎖である。

#### 硫黄を含む化合物

硫黄を含む化合物としては、硫化水素、二硫化水素、チオフェンの他に一般式  $CH_3S(CH_2)_nCH_3$  ( $n \geq 0$ ) で表される化合物を示すことができる。このような化合物としては、例えば硫化ジメチル  $(CH_3)_2S$  が挙げられる。また、一般式  $CH_3(CH_2)_mSS(CH_2)_nCH_3$  ( $m, n \geq 0$ ) で表される化合物を示すことができる。このような化合物としては、例えば二硫化メチル  $CH_3SSCH_3$  が挙げられる。一般式  $CH_3(CH_2)_nSH$  ( $n \geq 0$ ) で表される化合物を示すことができる。このような化合物としては、例えばエタントチオール  $CH_3CH_2SH$  を挙げることができる。更に、一般式  $SH(CH_2)_nSH$  ( $n \geq 1$ ) で表される化合物を示すことができる。このような化合物としては、例えばエタンジチオール  $SH(CH_2)_2SH$  等が挙げられる。

硫黄を含む化合物としては、この他に、チオフェン、メルカプトエタノール、あるいはジスレイトール等を示すことができる。これらの硫黄を含む化合物は、窒素を含む化合物と同様に膜の表面や内部が親水性となり、その表面には触媒活性物質の化学的な結合に有用なチオール基を与える。

#### 酸素を含む炭化水素化合物

酸素を含む炭化水素化合物としては、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、アセトアルデヒド、ベンズアルデヒド、アクロレイン、アクリル酸、メタクリル酸、メタクリル酸メチル、プロパギルアルコール、アセトン、あるいはメチルエチルケトン等を示すことができる。これ

らの化合物を原料として得られるプラズマ重合膜の内部は疎水性となる。その理由は、プラズマ重合時の成膜において酸素原子が膜内にとりこまれにくい性質を示すためである。したがって、膜内部は炭化水素のプラズマ重合膜と同様の構造（すなわち疎水性）となる。膜表面においては、酸素を含む官能基であるカルボキシル基、カルボニル基、アルデヒド基、あるいは水酸基等を備える。

この他、化学結合に利用することができる官能基は持たないものの、触媒活性物質の物理吸着に利用することができるプラズマ重合膜を与えるモノマーガス化合物材料として、以下のようなケイ素含有化合物、炭化水素化合物、ハロゲンガス、あるいは希ガス等を示すことができる。

#### 有機ケイ素化合物

有機ケイ素化合物としては、テトラメチルシラン、テトラメチルジシロキサン、ヘキサメチルジシロキサン、ヘキサメチルジシラザン、ヘキサメチルシクロトリシラザン、ジエチルアミノトリメチルシラン、トリメチルビニルシラン、テトラメトキシシラン、アミノプロピルトリエトキシシラン、オクタデシルジエトキシメチルシラン、およびヘキサメチルジシラン、およびジビニルテトラメチルジシロキサンを示すことができる。

炭化水素化合物としては、プロパギルアルコールのような-OH 基を含む化合物等を示すことができる。

モノマーガス原料には、アルゴン、ネオン、ヘリウム、クリプトン、あるいはキセノンのような希ガスを利用することもできる。

これらのモノマーガスは1種類のみを原料とすることもできるし、複数種のモノマーガスを混合して用いることもできる。また、単層ではなく第2のプラズマ重合膜を積層した構造とすることもできる。第2のプラズマ重合膜とする場合には、重合性あるいは非重合性モノマーの原料を利用することができる。たとえばアンモニアのような非重合性のモノマーガスを利用して第1のプラズマ重合膜をプラズマ処理すれば、その表面にアミノ基を導入することができる。第2のプラ

ズマ重合膜を利用することにより、基板側の素材を変えることなく、任意の官能基を導入することが可能となる。

プラズマ重合の条件、すなわちモノマーガスの流速、プラズマの放電電力、反応雰囲気圧の圧力、そして反応時間は、利用するモノマーガスに応じて当業者が適宜設定することができる。たとえば実施例に示したようにモノマーガスとしてヘキサメチルジシロキサンやアセトニトリルのような窒素含有化合物を用いた場合、流速：10-50cm<sup>3</sup>/min.、放電電力：20-100W、圧力 1-10Pa、放電時間 30 秒-5 分といった条件を示すことができる。プラズマ重合においては、装置やモノマーに合わせて最適な重合条件を設定する必要がある。W/FM（ここで W は放電電力、F は流速、M はモノマーの分子量）が同じであれば、膜質はほぼ同じであるとする報告(Yasuda, Plasma Polymerization, Academic Press, New York, 1985)がある。

本発明において、プラズマ重合膜は、触媒活性物質の固定を支えるとともに、その下に位置する金属電極パターンにシグナル生成物質を選択的に供給するための選択膜として機能する。そのために本発明においては、プラズマ重合膜によって試料と金属電極パターンとの直接的な接触を防ぐ構造とする必要がある。すなわち、プラズマ重合膜を介してのみ金属電極パターンと試料との接触が行われるようにするのである。このような構造は、たとえば実施例に示すように、金属電極パターンを持つ基板表面をプラズマ重合膜で覆ってしまうことにより実現することができる。あるいは、エッチング法によって露出する金属電極パターンを、プラズマ重合膜で被覆する方法を採用することもできる。プラズマ重合を利用すれば、複雑で微小な構造物に対しても均質なプラズマ重合膜コートを余すことなく施すことができる。したがって、微小で複雑な形状となることが多い金属電極パターンの被覆にあたり、プラズマ重合膜はたいへん有利な特徴を備えているとすることができる。

ここでいうシグナル生成物質とは、金属電極パターンとの電極反応により、電気的なシグナルをもたらすことができる物質を意味する。本発明において、シグ



ナル生成物質はプラズマ重合膜表面に結合した触媒活性物質の作用によって生成する。たとえば、グルコースオキシダーゼ等を固定した場合には、グルコースの酸化にともなって生成する  $H_2O_2$  がシグナル生成物質に相当する。そしてプラズマ重合膜は、 $H_2O_2$  を選択的に金属電極パターンに供給する。プラズマ重合膜は、膜質が緻密であるために 100 nm という極薄膜でもサイズ排除効果を有し、 $H_2O_2$  のような低分子を通過させ、妨害物質の干渉を抑えることができる。膜厚は、サイズ排除効果を十分生じることができる程度の厚みを持たせるのが望ましい。一方、迅速な応答を得るためには、薄い方が有利であり、両者はトレードオフの関係となる。最適な膜厚はモノマーガスの種類にも依存するが通常は 50 ~ 200 nm である。本発明においては、プラズマ重合膜がシグナル生成物質の選択性を持っているために、メディエータを利用することなく干渉性物質の影響を避けることができる。また本発明におけるプラズマ重合膜は、単に干渉性物質の透過を妨げるのみならず、たとえば  $H_2O_2$  のようなシグナル生成物質の選択透過膜としても機能する。すなわち、プラズマ重合膜の存在によって、 $H_2O_2$  に対する応答性能を高めることができるのである。

本発明において、プラズマ重合膜は、金属電極パターンの上に配置される。金属電極パターンは、白金、金、銀、グラファイト等、電気化学反応が起こるものなら特に限定されない。中でも  $H_2O_2$  に対してよく応答する白金が最適である。金属電極パターンを形成するにはマスクキング法が最適であり、エッチング法は適さない。金属電極パターンの膜厚は、100 ~ 1000 nm が望ましい。

金属薄膜パターンを施す基板には、プラズマ重合膜の形成も可能な素材を利用するのが望ましい。一般的な基板素材としては、ガラス、プラスチック、シリコン、あるいはセルロース等を示すことができる。ガラス基板では白金などの貴金属との相溶性が悪いが、いったんプラズマ重合膜を形成した後に白金薄膜のパターンを形成すれば密着性の向上が期待できる。形成された白金薄膜に、更にプラズマ重合膜を施すことにより、本発明によるバイオセンサーを構成することがで

きる。すなわち、任意の素材からなる基板上にいったんプラズマ重合膜を施し、その上に金属電極パターンを形成し、更にプラズマ重合膜を積層した構造を持つバイオセンサー（図2）は、本発明における望ましい態様を構成する。白金薄膜の形成を目的とするプラズマ重合膜としては、ガラスやシリコンに対する密着性に優れる有機ケイ素化合物等のモノマーガスを利用するのが有利である。有機ケイ素化合物としては、例えばテトラメチルシラン、テトラメチルジシロキサン、ヘキサメチルジシロキサン、ヘキサメチルジシラザン、ヘキサメチルシクロトリシラザン、ジエチルアミノトリメチルシラン、トリメチルビニルシラン、テトラメトキシシラン、アミノプロピルトリエトキシシラン、オクタデシルジエトキシメチルシラン、ヘキサメチルジシランまたはジビニルテトラメチルジシロキサン等が挙げられる。このプラズマ重合膜の膜厚は、10 nm 以上であればよい。ガラス基板への白金パターンの密着性を向上させるために5 nm 程度のクロム層を施す方法も知られているが、クロムはしばしば白金と合金化し、正常な電気化学信号を得られなくなる。

本発明において、プラズマ重合膜には触媒活性物質が固定される。触媒活性物質としては、オキシダーゼまたはデヒドロゲナーゼのような酵素が用いられる。触媒活性物質として利用することができるオキシダーゼには、以下のような酵素を示すことができる。

グルコースオキシダーゼ

ガラクトースオキシダーゼ

ビルビン酸オキシダーゼ

D-またはL-アミノ酸オキシダーゼ

アミノオキシダーゼ

コレステロールオキシダーゼ、および

コリンオキシダーゼ

触媒活性物質として利用することができるデヒドロゲナーゼには、以下のよう

な酵素を示すことができる。

アルコールデヒドロゲナーゼ

グルタミン酸デヒドロゲナーゼ

コレステロールデヒドロゲナーゼ

アルデヒドデヒドロゲナーゼ

グルコースデヒドロゲナーゼ

フルクトースデヒドロゲナーゼ

ソルビトールデヒドロゲナーゼ、および

グリセロールデヒドロゲナーゼ等

これらのオキシダーゼ、あるいはデヒドロゲナーゼは、基質の酸化（あるいは還元）を電気的な変化として直接的に捉えることができるため、本発明におけるバイオセンサーに好適な酵素である。すなわち、オキシダーゼに基づく酵素反応は、 $H_2O_2$  の生成を通じて電気的に捉えることができる。デヒドロゲナーゼの場合には、電子受容体として働くニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）やニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸（NADP）等の補酵素の還元型分子種（NADHやNADPH）の増減を電極反応により電気的に捉えることができる。

なお触媒活性物質は、プラズマ重合膜の表面に結合・固定することもできるし、あるいはプラズマ重合膜内部に包埋されていてもよい。触媒活性物質の包埋は、たとえば次のようにして実施される。すなわち、まず任意のモノマーガスで基板上にプラズマ重合膜を形成させる。このときのモノマーガスは、酸素やアルゴンがよく用いられる。次いで、酵素のような触媒活性物質と、メタクリル酸やアクリルアミドのようなモノマーとを含む水溶液に、この基板を浸漬する。基板上のプラズマ重合膜表面には活性種が存在するため、水溶液中のモノマーは重合を開始する。このとき、水溶液中に共存する触媒活性物質が包埋される。この技術はプラズマ開始重合と呼ばれている（プラズマ重合、東京化学同人、1986年）。酵

素を包埋する場合には、測定試料と接触するプラスチック重合膜が基質を透過するところから、単独でも良い、結合する触媒活性物質は、複数種の酵素をいっしょに固定することもできる。複数の酵素が関与する反応を電気的に捉えるには、反応が最も効率的に進行するような割合で必要な触媒活性物質を組み合わせて固定することができる。

触媒活性物質は、望ましくは金属電極/タンパク質上に形成されたプラスチック重合膜に固定される。このような構成とすることによって、両者が十分に接近し、触媒活性物質によって生成される  $H_2O_2$  のようなシグナル生成物質が金属電極/タンパク質に供給され易くなり、応答性能の向上が期待できる。プラスチック重合膜に酵素を固定化する方法は、物理吸着または架橋試薬による方法がある。安定に多量に固定化するには後者の方法が有利である。後者においては、プラスチック重合膜の表面の官能基と酵素の官能基を架橋試薬で結合するが、架橋試薬には公知のものを利用することができる。以下に、本発明に利用することができる架橋試薬を例示する。これらの中でも汎用性が高く、取り扱いの容易なグルタルアルデヒドが好ましい。

過ヨウ素酸、

N-スクシニミジル-2-アレイミド酢酸、

N-スクシニミジル-4-アレイミド酢酸、

N-スクシニミジル-6-アレイミドヘキサノ酸、

N-スクシニミジル-4-アレイミドメチルシクロヘキサノ-1-カルボキシ酸、

N-スクシニミジル-4-アレイミドメチルシクロヘキサノ-1-カルボキシ酸、

N-スクシニミジル-4-アレイミドメチル安息香酸、

N-スクシニミジル-3-アレイミド安息香酸、

N-スクシニミジル-4-アレイミドフエニル-4-酢酸、

N-スクシニミジル-4-アレイミドフエニル-4-酢酸、

N,N'-オキシジメチレン-ジアレイミド、

N,N' -o-フェニレン-ジマレイミド、  
N,N' -m-フェニレン-ジマレイミド、  
N,N' -p-フェニレン-ジマレイミド、  
N,N' -ヘキサメチレン-ジマレイミド、  
N-スクシニジルマレイミドカルボン酸、  
N-スクシニジル-S-アセチルメルカプト酢酸、  
N-スクシニジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、  
S-アセチルメルカプトスクシニックアンヒドライド、  
メチル-3-(4' -ジチオピリジル)プロピオニミデート、  
メチル-4-メルカプトブチルイミデート、  
メチル-3-メルカプトプロピオニミデート、  
イミノチオレン、  
o-カルボキシメチル-ヒドロキシルアミン、  
アゾジフェニルビルマレイミド、  
ビス(スルホサクシニイミジル)スベレイト、  
4,4' -ジイソチオシアノ-2,2' -ジスルホン酸スチルベン、  
4,4' -ジフルオロ-3,3' -ジニトロジフェニルスルホン、  
1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン、  
p-フェニレンジイソチオシアネート、  
ジメチルアジピミデート、  
ジメチルピメルイミデート、  
ジメチルスベルイミデート、  
p-アジドフェナシルプロマイド、  
p-アジドフェニルグリオキサル、  
N-ヒドロキシサクシニイミジル-4-アジドベンゾエイト、  
4-フルオロ-3-ニトロフェニルアジド、



メチル-4-アジドベンゾイミデイト、  
N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシニイミド、  
N-スクシイミジル-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエイト、  
1,4-ベンゾキノン、  
N-スクシニイミジル-3-(2'-ピリジルジチオ)プロピオネート、  
N-(4-マレイミドブチリロキシ)スルホスクシンイミドナトリウム塩、  
N-(6-マレイミドカプロイロキシ)スルホスクシンイミドナトリウム塩、  
N-(8-マレイミドカプロイロキシ)スルホスクシンイミドナトリウム塩、  
N-(11-マレイミドカプロウンデカノイロキシ)スルホスクシンイミドナトリウム  
塩、  
N-[2-(1-ピペラジニル)エチル]マレイミド二塩酸、  
ビスジアゾベンジジン、  
ヘキサメチレンジイオシアネート、  
トルエンジイソシアネート、  
ヘキサメチレンジイソチオシアネート、  
N,N'-エチレンビスマレイニンイミド、  
N,N'-ポリメチレンニスヨードアセトアミド、  
2,4-ジニトロベンゼンスルフォネートナトリウム塩、  
ジアゾ化合物あるいは縮合試薬が  $RN=C=NR$  (または  $R'$ ) で表されるカルボジイミ  
ド誘導体、  
N-ヒドロキシスクシイミド、  
トリ-n-ブチルアミン、  
ブチルクロロフォルメーテ、  
イソブチルイソシアニド

本発明によれば、プラズマ重合膜の採用により均質性の高いバイオセンサーの  
提供が可能となる。その結果、バイオセンサーを微小なチップとすることができ

る。たとえば、シリコン基板にプラズマエッチングを利用して微小な溝を形成し、この溝内に金属電極パターンを形成するとともに、溝をセルとして微量液体試料のフローセルとして利用する技術が公知である (Analytical Chemistry 65, 2731-2735, 1993, Analytical Chemistry 69, 253-258, 1998)。このようなマイクロチップに本発明を応用し、バイオセンサーチップを構成することができる。たとえば、前記金属電極パターンを形成した微小な溝をプラズマ重合膜で覆い、更に触媒活性物質を固定化するのである。公知のマイクロチップと同様の手法で微量液体試料を溝内に導入すれば、触媒活性物質の作用により分析が実施される。本発明においてはプラズマ重合膜を採用したことから、マイクロチップの微小な構造を変えることなく、均一なプラズマ重合膜を施すことができる。

本発明によるバイオセンサーは体内留置型センサーへも応用することができる。たとえば、体内留置型センサーとして血糖のリアルタイムモニタリングと、その測定値に基づくインスリンの自動投与システムが公知である (BIOmedica 北隆館、5 巻 5 号、458-466、1990 年)。このようなセンサーに本発明によるバイオセンサーを利用すれば、毒性を示す恐れのあるメディエータを利用していない上に、センサーに固定した触媒活性成分が溶出する恐れも低いので、より安全なセンサーとなる。また針のような構造物であっても均一にプラズマ重合膜コートすることができることも、本発明の有利な点となる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、典型的なプラズマ重合装置の図である。

図 2 は、本発明によるバイオセンサーの構造を示す断面図、ならびに分解平面図である。

図 3 は、本発明のバイオセンサーによる検量線である。縦軸は電流値変化 ( $\mu A$ ) を、横軸はグルコース濃度 (mM) を示す。

図 4 は、本発明のバイオセンサーのグルコースに対する時間応答曲線である。

縦軸は電流値変化 ( $\mu A$ ) を、横軸は時間 (秒) を示す。

図 5 は、プラズマ重合膜上にパターン形成した白金電極の  $H_2O_2$  に対する電極応答サイクリックボルタモグラム。縦軸は電流値 ( $\mu A$ ) を、横軸は電圧 (mV) を示す。

図 6 は、アセトニトリルをモノマーガスとして成膜したプラズマ重合膜内の様々な夾雑物質の拡散係数を示した図である。縦軸はプラズマ重合有る場合の拡散係数: D2 / プラズマ重合膜が無い場合の拡散係数: D1 を、横軸は各物質の濃度 (mM) を示す。

(符号の説明) 1 基板、2 プラズマ重合膜、3 白金電極パターン、4 プラズマ重合膜、5 酵素

#### 発明を実施するための最良の形態

以下実施例に基づいて、本発明を詳細に説明する。

##### (実施例 1)

本発明に基づくバイオセンサーの一例として、GOD を利用したグルコースセンサーを説明する。本発明のグルコースセンサーの構造を図 2 に示す。製造の詳細は次の通りである。まずガラス基板を洗浄し、ヘキサメチルジシロキサン of プラズマ重合膜 1 を約 100 nm 成膜させた。プラズマ重合の条件は、次のとおりである。

流速:  $15 \text{ cm}^3/\text{min}$ 、

放電電力: 40W、

圧力: 4.6Pa、

放電時間: 1 分、

次に、マスクを用いてスパッタ法で白金電極のパターン 2 を約 100 nm 形成させた。続いて、マスクを取り除き約 50 nm のアセトニトリルプラズマ重合膜を形成した。このときのプラズマ重合の条件は、次のとおりである。

流速:  $15 \text{ cm}^3/\text{min}$ 、

放電電力：80W、

圧力：2 Pa、

放電時間：1 分

この膜の表面には高密度のアミノ基が存在する。このアミノ基を利用し、架橋試薬のグルタルアルデヒドを用いて酵素の固定化を行った。1%のグルタルアルデヒド溶液を表面に滴下して約20分放置後、蒸留水で洗浄し、10 mg/mL のグルコースオキシダーゼ溶液 (pH7、50 mM、リン酸緩衝液) を滴下した。さらに、0.1%のグルタルアルデヒド溶液を滴下し、約20分放置後蒸留水でよく洗浄した。このバイオセンサーの検出原理は次のとおりである。すなわち、まずグルコースオキシダーゼによるグルコースの特異的な酸化反応 (第1反応) が起こる。この反応にともなって生成した  $H_2O_2$  がプラズマ重合膜を通過し白金電極で電気化学的に検出される (第2反応)。

第1反応：グルコース + 酸素  $\rightarrow$  グルコノラクトン +  $H_2O_2$

第2反応： $H_2O_2 \rightarrow 2H^+ + \text{酸素} + 2e^-$

このとき、プラズマ重合膜を通過できるのはサイズの小さい  $H_2O_2$  のみで、血液中に含まれる夾雑物質は膜を通過できない。そのため、公知のバイオセンサーでは干渉成分として作用していたアスコルビン酸や尿酸等の影響を受けることなく、効率よくグルコース濃度を電流値の変化として検出できる。また、後述するがアセトニトリルのプラズマ重合膜内に対して  $H_2O_2$  は溶液バルク状態よりも拡散係数が大きくなり、速やかに電極反応する。この結果は、本発明のバイオセンサーが高濃度領域のグルコースに対しても飽和することなく応答することを意味する。

このようなバイオセンサーの製造過程は、最後の酵素の固定化を除いて全てドライプロセスで実施することができる。場合によっては、金属電極パターンの形成からプラズマ重合膜の形成まで一つのチャンバーで作製することも可能である。このような製造工程によれば、センサー特性の再現性が向上し、コストの低下や、優れた量産性を実現することができる。

また、極微細化も容易である。加えて微小化に伴って相対的に電気化学検出法の効率が高まることが期待できる。一般的に、分光学的検出での検出対象がサイズの3乗に比例して減少していくのに対して、電気化学検出ではサイズの2乗に比例して減少するとされているからである。更に本発明による検出法では電気化学検出法を採用しているため、微小化により試薬や試料の消費量を抑えることができる。メディエータのような有毒物質も使用していないので体内留置型センサーの実現も可能である。

本実施例で得られたグルコースセンサーで、実際にグルコース濃度の測定を試みた。すなわち、種々のグルコース水溶液（0～60 mM）に上記バイオセンサーを接触させ、サイクリックボルタンメトリーにおいて、50mV/秒の sweep 速度で銀／塩化銀に対して0-1V 範囲を測定し、500mV 時の酸化電流を酸化電流値として採用した。結果は図3に示した。図3は、酸化電流値とグルコース濃度を示すものである。電流値は、グルコース濃度が5～60 mM の範囲で良好な直線性を示すことがわかる。これは、特開平 1-253648、特公平 5-24453、特開平 6-213858、特開平 1-156658、特公平 6-58338、特開昭 63-139243 に示すグルコースセンサーで得ることができる直線性（5.6～33.6 mM）を大きく上回る性能といえる。また、検出限界は0.04 mM であり（信号／雑音比 3）、従来のセンサーに比べて高いことがわかる。プラズマ重合膜がないグルコースセンサーでは（ガンマアミノトリメトキシシランで固定化した）酵素の固定化量が少ないためにセンサーの電流応答値が低いことがわかる。この結果は、白金薄膜状に約100 nm のプラズマ重合膜の上に高密度の酵素が固定化され、酵素反応部位と電極の距離が極めて近いためにグルコースの高濃度領域においても良好な直線性を示していると考えられる。

続いて、本発明によるバイオセンサーのグルコース溶液に対する応答特性を公知の構造のバイオセンサーと比較した。結果は図4に示した。図4は、500mV の定電位での酵素反応による電流値の時間変化を測定した結果である。グルコース



濃度は 17.5mM である。定常状態になるまでに約 15 秒を要している。特公平 5-24453 に示すグルコースセンサーでは応答に 30 秒以上が必要であるのに対して、本発明のバイオセンサーの応答速度が極めて速いことがわかる。これは、酵素反応の場所と電極反応の場所の距離が極めて近いためであると考えられる。

更に本発明に基づくバイオセンサーにおいて、1mM のグルコースの正常な応答が様々な夾雑物質によってどのくらい影響を受けるかを調査した。表 1 に示したような夾雑物質を 1mM のグルコース溶液に添加し、本発明によるバイオセンサーの応答に及ぼす影響を観察した。結果は表 1 に示す。これより、プラズマ重合膜により夾雑物質の影響を抑えられていることがわかる。

表 1

夾雑物質 濃度 (mM)	アスコルビン酸		尿素		アセトアミノフェン	
	膜なし	膜あり	膜なし	膜あり	膜なし	膜あり
0.1	12.6	-14.1	-1.97	-4.68	27.0	1.70
0.2	22.9	-10.6	-7.38	-5.23	51.0	20.4
0.3	33.0	-1.35	-14.1	-5.77	77.2	38.9
0.6	48.2	23.5	-3.94	-5.95	141	84.5
0.9	92.1	46.2	-7.29	-6.49	238	150
1.2	106.8	68.2	9.31	-9.01	321	199

グルコース 1mM のみの電流値を  $I_1$ 、グルコース 1mM+他の夾雑物質が共存したときの電流値を  $I_2$  としたとき、 $(I_2-I_1)/I_1 \times 100$  の値。

膜なし：プラズマ重合膜なしで酵素を固定化した場合

膜あり：プラズマ重合膜ありで酵素を固定化した場合

#### (実施例 2)

プラズマ重合膜上の白金電極パターンの電極応答特性を調べた。図 2 に示すグルコースセンサーにおいて、酵素を固定せず基板 1、プラズマ重合膜 2、および白金薄膜 3 で構成されるセンサーについて、様々な濃度の  $H_2O_2$  に対する応答を調

べた。図 5 に結果を示す。参照電極には銀／塩化銀を用いた。Sweep 速度は、50mV/s である。この結果より、本発明を構成する白金電極は  $H_2O_2$  に対して良好な電極応答を示している。また、長時間水溶液に浸していてもはがれることはない。したがって、プラズマ重合膜表面の白金電極は、バイオセンサーの電極として十分な性能を備えていることがわかる。これに対して、ガラス基板やプラスチック基板上に形成された白金電極は水に浸すと簡単にはがれ落ちてしまう。

#### (実施例 3)

アセトニトリルプラズマ重合膜 4 上のアミノ基の存在の確認を行った。この膜の表面のアミノ基の存在を確認するために次のような実験を行った。すなわち、膜表面をアミノ基と特異的に反応する試薬ペンタフルオロベンズアルデヒドの蒸気に 8 時間さらしたあと X 線光電子分光測定を行った。その結果、表面から約 7% 以上のフッ素原子が検出された。修飾試薬のフッ素原子が検出されたことは、ペンタフルオロベンズアルデヒドが表面のアミノ基と特異的に反応したことを示している。つまりアセトニトリルプラズマ重合膜の表面には、高密度のアミノ基が存在していることを意味する。このアミノ基を用いて酵素を共有結合的に固定化できる。

#### (実施例 4)

プラズマ重合膜のサイズ効果を調べるために次の実験を行った。実施例 2 と同様に酵素を固定化しないデバイスを用い、この膜について様々な夾雑物質の拡散係数をクロノクーロメトリー法で調べた。夾雑物質として用いた化合物は、 $H_2O_2$ 、ビタミン C、ドーパミン、およびアセトアミノフェンである。結果を図 6 に示す。プラズマ重合膜を持たず、白金電極パターンが露出したデバイスの拡散係数と、白金電極パターン上にプラズマ重合膜を成膜したデバイスの拡散係数の比を比べると、 $H_2O_2$  は 1.8~2.4 であるのに対して、他の物質は概して 0.1~0.5 である。分子サイズを考慮すると、この結果はプラズマ重合膜がサイズ効果により  $H_2O_2$  の選択膜になっていることを裏付けている。更に、 $H_2O_2$  の拡散係数が白金電極パタ

ーンが露出したものに比べて2倍以上になっている事実は、アセトニトリルプラズマ重合膜が、 $H_2O_2$ を選択的に通しやすいことを意味する。

### 産業上の利用の可能性

本発明のプラズマ重合膜を用いたグルコースセンサーには次のような利点がある。現在市販されているグルコースセンサーと同等、あるいはそれ以上の性能を備え、かつ、より簡便な製作プロセスを実現できる。

迅速かつ簡便であるという長所を持つバイオセンサーを、今後さらに広い範囲で応用することを考えると微小化・一体化・集積化・量産化が可能な技術でのバイオセンサーシステムを構築する必要がある。そのための技術としてマイクロマシン技術があるが、本発明の技術はドライプロセスであるためにマイクロマシン技術との融合が容易である。

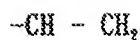
微小化センサーでは体内に留置し、連続測定することができる。本発明によるバイオセンサーは、単に小型化できるのみならず、酵素をメディエータ修飾する必要がないので、安全性にも寄与する。

本発明のバイオセンサーは、有機膜でありながら架橋度の高い緻密な極薄膜であるプラズマ重合膜を利用したことにより以下のような利点をもたらす。まずサイズ効果およびイオン官能効果によって $H_2O_2$ のみを選択的に通過し、他の夾雑物質の影響を取り除くことができる。プラズマ重合膜は、100nm 前後の超薄膜で、電極と酵素を近づけて固定化することができるために反応生成物の電極との反応効率がよく、反応速度が早く、高濃度の基質（グルコース）も測定することができる。また表面にアミノ基やチオール基のような酵素固定化のための官能基を高密度に導入することができるので高密度に酵素を固定化できる。

プラズマ重合膜は、金属電極パターン表面に密着性よく、均質に、薄く、再現性よく作製できる。しかも製造プロセスが容易で、半導体加工技術との融合が容易であるので極微小化が可能である。

## 請求の範囲

1. 以下の要素で構成されるバイオセンサー。
  - a) プラズマ重合膜
  - b) プラズマ重合膜に固定された触媒活性物質、および
  - c) プラズマ重合膜を介して試料と接触する金属電極パターン
2. 金属電極パターンがプラズマ重合膜上に形成され、この金属電極パターンの上に更にプラズマ重合膜を有する請求項1に記載のバイオセンサー
3. 触媒活性物質がプラズマ重合膜上に架橋試薬によって共有結合されている請求項1に記載のバイオセンサー。
4. 触媒活性物質が酵素である請求項1に記載のバイオセンサー。
5. 酵素がオキシダーゼまたはデヒドロゲナーゼである請求項4に記載のバイオセンサー。
6. オキシダーゼが、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、D-またはL-アミノ酸オキシダーゼ、アミノオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼおよびコリンオキシダーゼからなる群から選択される請求項5に記載のバイオセンサー。
7. デヒドロゲナーゼが、アルコールデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、フルクトースデヒドロゲナーゼ、ソルビトールデヒドロゲナーゼおよびグリセロールデヒドロゲナーゼからなる群から選択される請求項5に記載のバイオセンサー。
8. プラズマ重合膜が-COOH基、-CHO基、-SH基、-NH<sub>2</sub>基、-OH基、=NH基、-CONH<sub>2</sub>基、-NCO基、-CH=CH<sub>2</sub>基、=C=O基、および



からなる群から選択される官能基の1または2以上を含む、請求項1に記載のバイオセンサー。

9. プラズマ重合膜が2層以上の多層構造をなすことを特徴とする、請求項1に記載のバイオセンサー。

10. プラズマ重合膜に、重合性あるいは非重合性モノマーの原料により第2のプラズマ重合膜を積層した、請求項1に記載のバイオセンサー。

11. 前記非重合性モノマー原料が窒素、アンモニア、ヒドラジン、硫化水素、二硫化水素、酸素、水素、水、ハロゲンガス、および希ガスからなる群から選択される請求項10に記載のバイオセンサー。

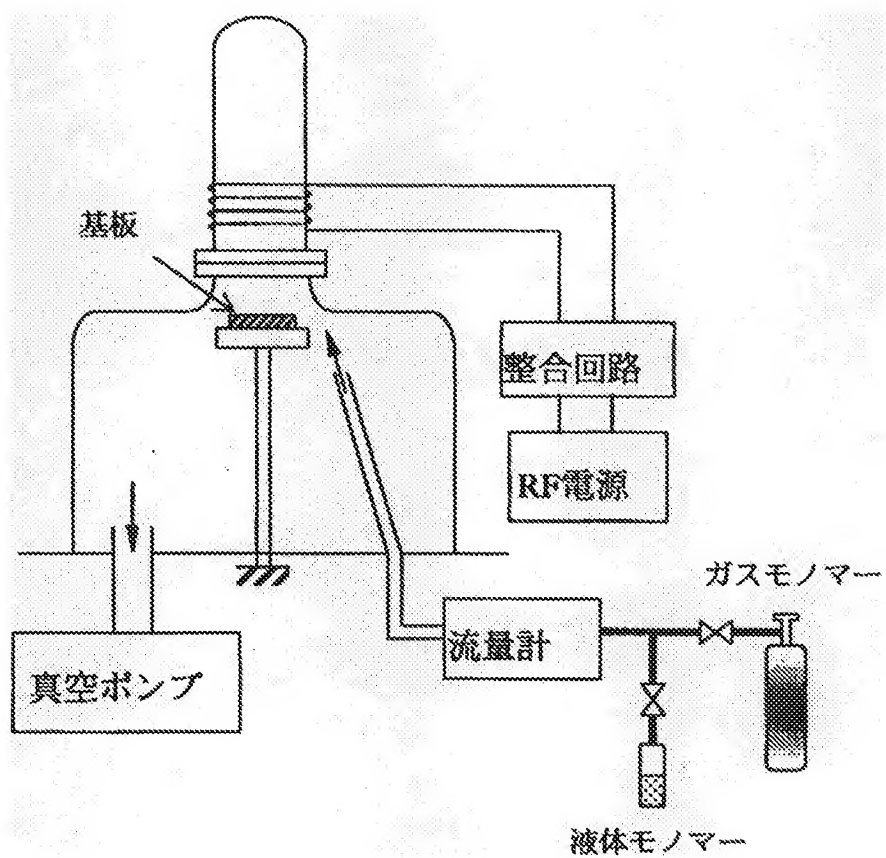
12. 次の工程を含む触媒活性物質による基質成分の測定方法において、バイオセンサーがプラズマ重合膜を介して試料と接触する金属電極パターンを備え、かつプラズマ重合膜に触媒活性物質を固定したバイオセンサーである測定方法

- a) 触媒活性物質を固定したバイオセンサーに試料を接触させる工程
- b) 触媒活性物質と基質との反応に伴う電気的な変化を電極によって検知する工程



1 / 6

図1



2 / 6

図 2

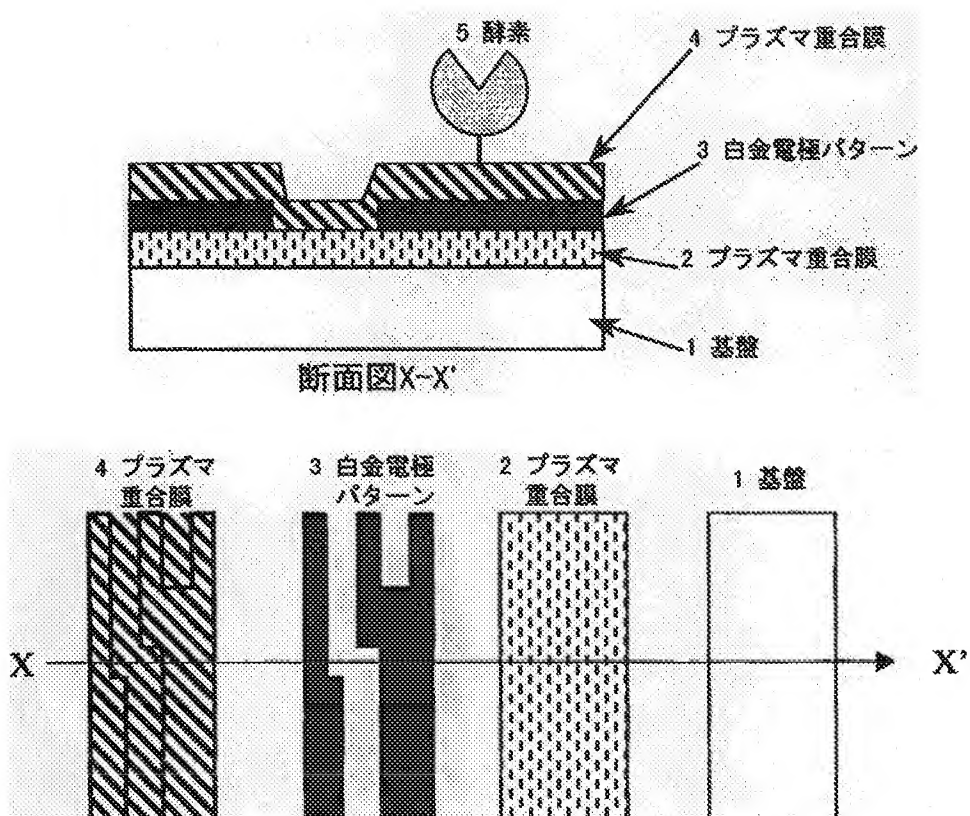
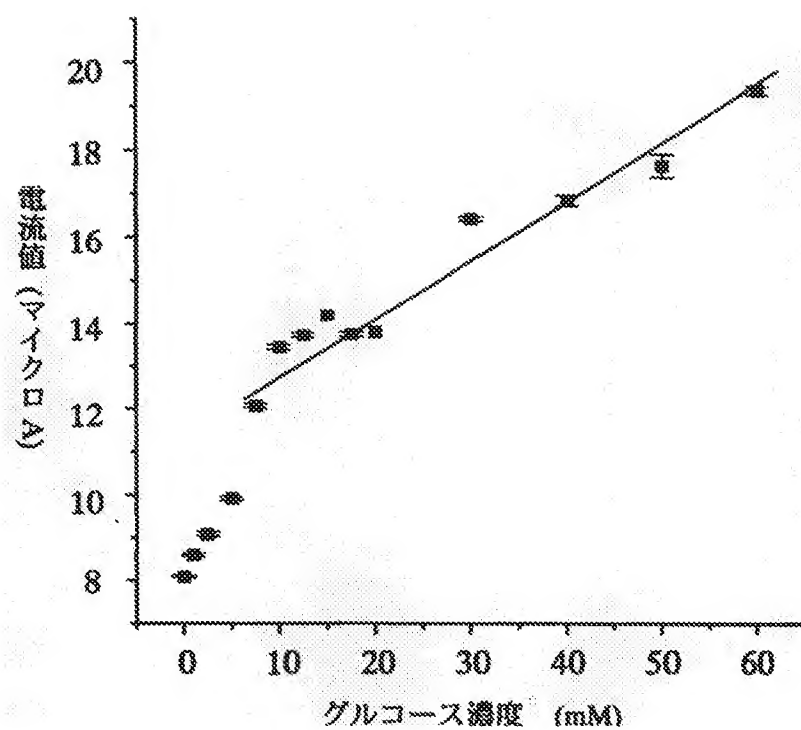
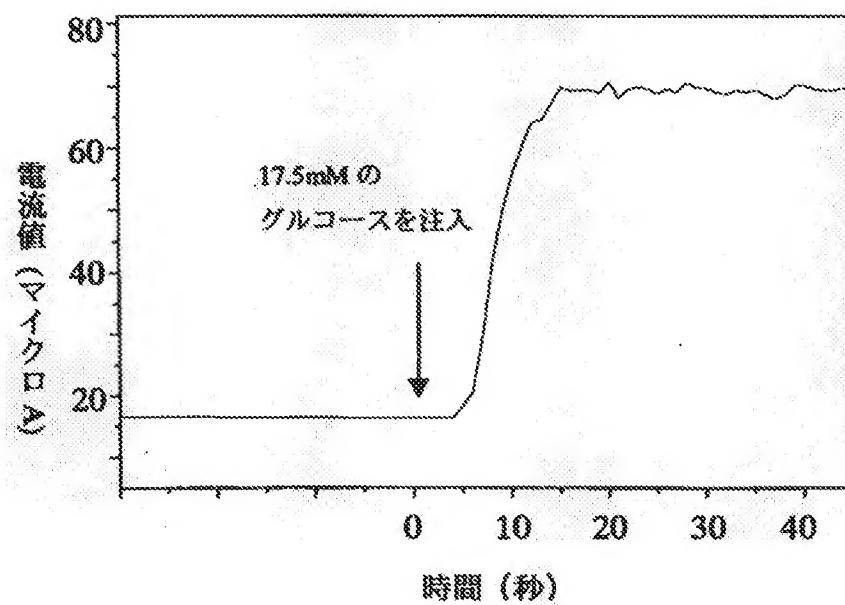


図 3



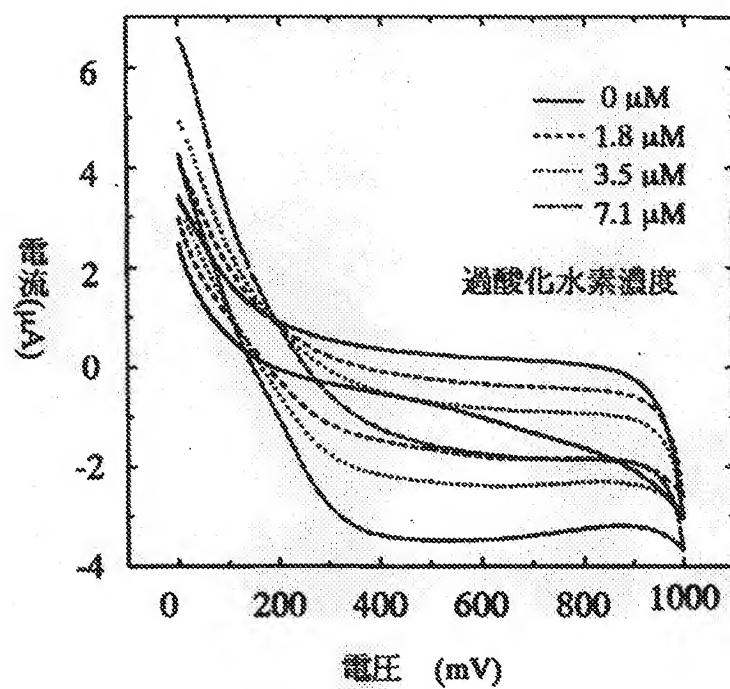
4 / 6

図4



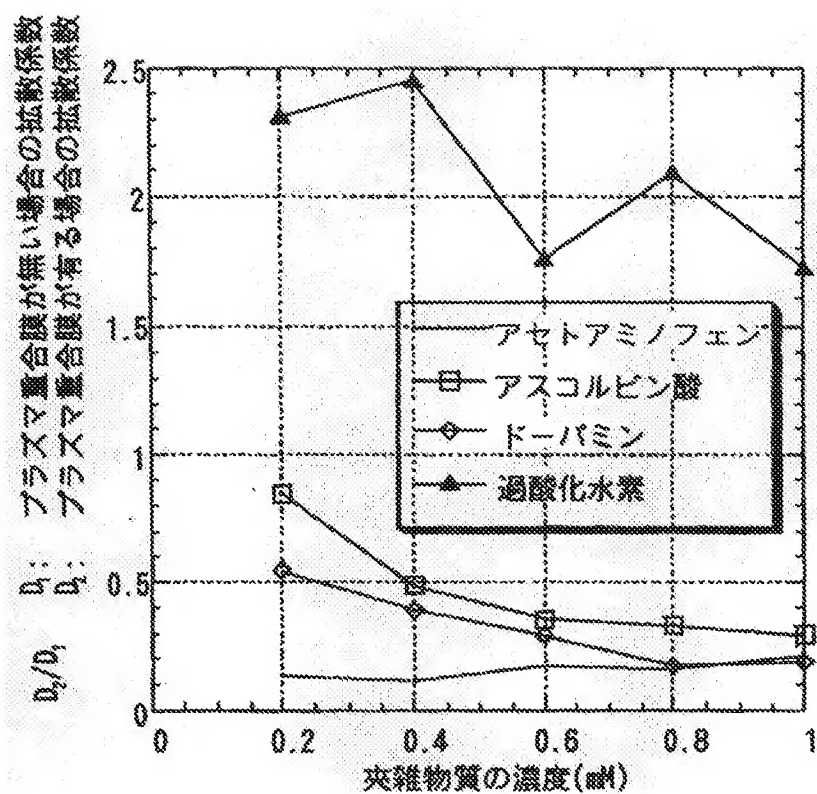
5 / 6

図 5



6 / 6

図 6





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02417

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> G01N27/327 C12Q1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> G01N27/327 C12Q1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS) PLASMA POLYMER \* ENZYME

CA FILE [PLASMA? (W) POLYMER?]\*ENZYME?

WIPL (DIALOG) [IC=C12Q-001]\*[PLASMA? (W) POLYMER?]

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Anal. Lett., 22 (11/12) p.2423-2431 (1989) p.2425 1.7-p.2426 1.19 & Fig.1	1-6.8-12 7
A	Microchem. J., 53(2) p.207-214 (1996)	1-12
A	ASS Symp. Ser. (Am Chem Soc) , no.690 p.57-65 (1998)	1-12
Y	JP, 02-061549, A (NOK K.K.), 01 March, 1990 (01.03.90), page 1, lower right column, 4 <sup>th</sup> line from the bottom to page 2, lower left column, line 5 (Family: none)	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
11 May, 2000 (11.05.00)Date of mailing of the international search report  
23 May, 2000 (23.05.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/02417

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N27/327 C12Q1/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N27/327 C12Q1/00

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2000年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2000年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2000年

## 国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS) プラズマジュウゴウ\*コウソ  
 CAファイル [PLASMA? (W) POLYMER?]\*ENZYME?  
 WIPL (DIALOG) [IC-C12Q-001]\*[PLASMA? (W) POLYMER?]

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Anal. Lett., 22(11/12)p. 2423-2431 (1989) p. 2425 l. 7-p. 2426 l. 19 & Fig. 1	1-6. 8-12 7
A	Microchem. J., 53(2) p. 207-214 (1996)	1-12
A	ASS Symp. Ser. (Am Chem Soc), no. 690 p. 57-65 (1998)	1-12
Y	JP, 02-061549, A (エヌオーケー株式会社) 1. 3月. 1990 (01. 03. 90) 第1頁右下欄下から4行~第2頁左下欄5行 (ファミリーなし)	1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 05. 00

国際調査報告の発送日

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

郡山 順

電話番号 03-3581-1101 内線 3252